

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

FR 00/ 0 2 4 8 1
FR 00/ 2481

REC'D 24 OCT 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 OCT. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

10 SEP. 1999

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9911493**

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **MA**

DATE DE DÉPÔT

10 Sept 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

À LAQUELLE CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMÉNIE

232, avenue du Prado

13295 MARSEILLE CEDEX 8

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

H52337C1 MFD

04.91.76.55.30

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Oligonucléotides monocaténaux, sondes, amorces et procédé de détection des spirochètes

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RAOULT Didier

Forme juridique

Nationalité (s)

FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

16, rue de Lorraine

13008 MARSEILLE

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

HERARD Paul (CPI BREVET 94-1205)

Paul Hérad

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

[Signature]

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DESIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Réf. Mandataire H52337C1 MFD

N° d'enregistrement national :

99 11 493

Titre de l'invention :

Oligonucléotides monocaténares, sondes, amorces et procédé de détection des spirochètes

Les Soussigné(s) :

RAOULT Didier
16, rue de Lorraine

13008 MARSEILLE

désigne(nt) en tant qu'inventeur(s) (nom, prénoms, adresse)

RAOULT Didier -
16, rue de Lorraine -

13008 MARSEILLE -

DRANCOURT Michel
5, traverse de la Pauline

13012 MARSEILLE

Date et
signature(s) du(des) demandeur(s) ou du mandataire

MARSEILLE, le 10 septembre 1999

Paul Herard

Paul HERARD - CPI BREVET 94-1205
Cabinet BEAU DE LOMENIE

La présente invention concerne le domaine des techniques de détection et/ou d'amplification et de séquençage, à l'aide de sondes ou d'amorces oligonucléotidiques, et l'application de ces sondes ou amorces pour détecter la présence ou identifier les bactéries de l'ordre des *Spirochaetales* (spirochètes).

5 Dans le cadre de certains tests de diagnostic, notamment lors d'une recherche d'infection humaine ou animale dans le système nerveux ou d'une recherche après piqure d'arthropode par exemple, il est souvent nécessaire d'obtenir une réponse rapide concernant la présence de bactéries, et plus précisément de spirochètes, dans un échantillon. Toutefois, les techniques couramment développées, telles qu'un
10 examen direct après coloration de Gram ou une mise en culture, sont souvent mises en échec par l'absence de prise de colorant de Gram et l'absence de croissance dans les milieux de culture.

Dans le cas des spirochètes, qui constituent une famille de bactéries regroupant les espèces *Leptospira*, *Borrelia*, *Treponema* et *Serpulina* et étant responsables de
15 maladies infectieuses, telles que la méningoencéphalite, la mise en culture n'est pas possible. L'identification des spirochètes n'a donc pas encore été résolue.

Etant donné l'accroissement de ces maladies infectieuses ces vingt dernières années et les conséquences dramatiques de ces états pathologiques infectieux, il est nécessaire de mettre au point une méthode rapide et spécifique de détection des
20 pathogènes infectieux que sont les spirochètes.

Une solution possible, permettant de palier à l'impossibilité d'une mise en culture des bactéries, réside dans l'utilisation des technologies relatives aux acides nucléiques et au matériel génétique, notamment des méthodologies PCR (Polymerase Chain Reaction), afin de déterminer si un gène, une partie de gène ou une séquence
25 nucléotidique est présent chez un organisme vivant, un extrait cellulaire de cet organisme ou un échantillon. Etant donné que tout gène ou partie de gène est caractérisé par une séquence spécifique de bases nucléotidiques, il est par conséquent possible de rechercher directement la présence de tout ou partie de ladite séquence spécifique au sein d'un échantillon contenant un mélange de polynucléotides.

30 Différents types de méthodes de détection des acides nucléiques sont décrits dans la littérature. Ces méthodes reposent sur les propriétés d'appariement purine-

pyrimidine des brins complémentaires d'acides nucléiques dans les duplex ADN-ADN et ARN-ARN. Ce processus d'appariement s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogène entre les bases adénine-thymine (A-T) et guanine-cytosine (G-C) de l'ADN double brin. Des paires de bases adénine-uracile (A-U) peuvent également se former par liaison hydrogène dans les duplex ADN-ARN ou ARN-ARN. L'appariement de brins d'acide nucléique pour la détermination de la présence ou de l'absence d'une molécule d'acide nucléique donnée est communément appelé "hybridation d'acides nucléiques" ou simplement "hybridation".

10 Un exemple de méthodologie PCR comprend la détermination d'une séquence sur la base de l'ARNr 16S. Toutefois, cette méthode présente des limites liées aux problèmes potentiels de contaminations qui gênent le diagnostic.

Pour pallier à cet inconvénient, de nouveaux marqueurs génétiques permettant la détection spécifique de bactéries appartenant à l'ordre des spirochètes dans tout échantillon, sans étape préalable de culture bactérienne, ont été trouvés. Ces nouveaux marqueurs, qui sont des oligonucléotides, constituent un objet de l'invention.

La détermination de ces nouveaux marqueurs repose sur l'utilisation de séquences spécifiquement définies dans le gène *rpoB* des spirochètes codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. En effet, on a trouvé sur l'ADN codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne, des zones qui sont variables selon les familles bactériennes, mais qui apparaissent conservées parmi l'ordre des spirochètes, ce qui permet de discriminer cette famille bactérienne parmi d'autres familles bactériennes. L'observation selon laquelle il existe dans lesdites zones conservées des variations mineures de séquences entre certaines espèces de spirochètes a permis de mettre au point ces marqueurs spécifiques de l'ordre des spirochètes.

Selon Lazcano et al. [J. Mol. Evol. (1988) 27:365-376], les ARN polymérases sont divisées en deux groupes selon leur origine, l'un constitué par les ARN polymérases virales ARN- ou ADN-dépendantes, et l'autre constitué par les ARN polymérases ADN-dépendantes d'origine eucaryote ou procaryote (archaebactéries et

eubactéries). Les ARN polymérases ADN-dépendantes eubactériennes sont caractérisées par une constitution multimérique simple et conservée notée "core enzyme", représentée par $\alpha\beta\beta'$, ou "holoenzyme" représentée par $\alpha\beta\beta'\sigma$ [Yura and Ishihama, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 : 59-97].

5 De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle fonctionnel, au sein du complexe enzymatique multimérique, de la sous-unité β de l'ARN polymérase eubactérienne. Les ARN polymérases archaebactérienne et eucaryote présentent, pour leur part, une structure plus complexe pouvant atteindre une dizaine, voire une trentaine de sous-unités [Pühler et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86 :4569-10 4573].

Les gènes qui codent pour les différentes sous-unités $\alpha\beta\beta'\sigma$ de l'ARN polymérase ADN-dépendante chez les eubactéries, respectivement les gènes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoD*, sont classés en différents groupes comprenant des gènes codant pour des protéines constitutives des sous-unités ribosomiques ou pour des enzymes 15 impliquées dans la réplication et la réparation du génome [Yura and Yshihma, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 :59-97]. Certains auteurs ont montré que les séquences nucléiques des gènes *rpoB* et *rpoC* pouvaient être utilisées afin de construire des arbres phylogénétiques [Rowland et al., Biochem. Soc. Trans. (1992) 21:40s] permettant de séparer les différents embranchements et sous-embranchements parmi 20 les règnes du vivant.

Avant d'exposer plus en détail l'invention, différents termes, utilisés dans la description et les revendications, sont définis ci-après :

- par "acide nucléique extrait de bactéries" on entend soit l'acide nucléique total, soit l'ADN génomique, soit les ARN messagers, soit encore l'ADN obtenu à 25 partir de la transcription inverse des ARN messagers ;

- un "fragment nucléotidique" ou un "oligonucléotide" sont deux termes synonymes désignant un enchaînement de motifs nucléotidiques caractérisé par une séquence informationnelle des acides nucléiques naturels (ou éventuellement 30 modifiés) et susceptibles de s'hybrider, comme les acides nucléiques naturels, avec un fragment nucléotidique complémentaire ou sensiblement complémentaire, dans des conditions prédéterminées de stringence stricte. L'enchaînement peut contenir des

motifs nucléotidiques de structure différente de celle des acides nucléiques naturels. Un fragment nucléotidique (ou oligonucléotide) peut contenir par exemple jusqu'à 100 motifs nucléotidiques. Il contient généralement au moins 10, et en particulier au moins 12 motifs nucléotidiques et peut être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- un motif nucléotidique est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs précédents ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide [PE Nielsen et al., Science, (1991) 254:1497-1500], soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple par remplacement par des esters choisis notamment parmi les diphosphates, les alkyl- et arylphosphonates et les phosphorothioates,

- par " séquence informationnelle ", on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information analogue à celle donnée par la séquence des acides nucléiques naturels,

- par " hybridation ", on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de s'associer par des liaisons hydrogène stables et spécifiques, pour former un double brin. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la " stringence ", c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est fonction notamment de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction d'hybridation, tels que la concentration et le

type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépend notamment des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent éventuellement être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine. En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65 °C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1M,

10 - une " sonde " est un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 12 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un acide nucléique ayant, dans le cas présent, une séquence nucléotidique comprise soit dans un ARN messager, soit dans un ADN
15 obtenu par transcription inverse dudit ARN messager, produit de transcription; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection) ou à des fins de thérapie,

20 - une " sonde de capture " est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption, ou par synthèse directe sur un solide. Des exemples de supports comprennent les plaques de microtitration et les puces à ADN,

25 - une " sonde de détection " peut être marquée au moyen d'un agent marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, les enzymes, en particulier les enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline), les composés chimiques chromophores, les composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, les analogues de bases nucléotidiques et les ligands tels que la biotine,

30 - une " sonde d'espèce " est une sonde permettant l'identification de l'espèce d'une bactérie,

 - une " sonde de genre " est une sonde permettant l'identification du genre d'une bactérie,

- une " amorce " est une sonde comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR, dans un procédé de séquençage, dans
5 une méthode de transcription, etc.

Un premier objet de la présente invention est un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4 décrites dans le listage de séquences en fin de description et parmi les
10 oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.

En particulier, un oligonucléotide selon la présente invention possède au moins 12 motifs tels que décrits ci-dessus et au plus 50 motifs. Plus particulièrement, un oligonucléotide selon la présente invention possède de 12 à 35 motifs.

Un oligonucléotide préféré a une séquence choisie parmi les séquences
15 SEQ ID N°1 à 4.

La séquence SEQ ID N°1, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n°1, possède 20 acides. La séquence SEQ ID N°2, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n° 2, possède 21 acides nucléiques. La séquence SEQ ID N°3, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n° 3, possède 20 acides nucléiques. Enfin, la
20 séquence SEQ ID N°4; qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n°4, possède 17 acides nucléiques.

Lesdites amorces n° 1 à 4 sont consensuelles entre les spirochètes, sont spécifiques des spirochètes et encadrent une zone dont la séquence est spécifique de l'espèce et du genre serovar dans une espèce de spirochète.

25 Les séquences SEQ ID N°1 à 4 peuvent être préparées par synthèse chimique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans l'article de Itakura K. et al. [(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323].

Une première application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries appartenant à l'ordre des spirochètes qui comprend une séquence nucléotidique d'au
30 moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences

SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4, et leurs séquences complémentaires. Dans la suite de la description, une telle sonde de l'invention sera appelée sonde de genre.

Les sondes selon l'invention peuvent être utilisées, à des fins de diagnostic, dans la recherche de la présence ou de l'absence d'un acide nucléique cible dans un échantillon, selon toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques de dépôt ponctuel sur filtre, dites " DOT-BLOT " [Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor], les techniques de transfert d'ADN dites " SOUTHERN BLOT " [Southern. E.M., J. Mol. Biol. (1975) 98:503], les techniques de transfert d'ARN dites " NORTHERN BLOT ", ou les techniques dites " sandwich " [Dunn A.R., Hassel J.A. (1977) Cell 12:23]. On utilise en particulier la technique " sandwich ", avec une sonde de capture et/ou une sonde de détection, lesdites sondes étant capables de s'hybrider avec deux régions différentes de l'acide nucléique cible, et l'une au moins desdites sondes (généralement la sonde de détection) étant capable de s'hybrider avec une région de la cible qui est spécifique de l'espèce ou du groupe d'espèces recherché, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent avoir des séquences nucléotidiques au moins partiellement différentes.

L'acide nucléique à détecter (cible) peut être de l'ADN ou de l'ARN (l'un ou l'autre éventuellement obtenu après amplification par PCR). Dans le cas de la détection d'une cible de type acide nucléique double brin, il convient de procéder à la dénaturation de ce dernier avant la mise en œuvre du procédé de détection. L'acide nucléique cible peut être obtenu par extraction selon les méthodes connues des acides nucléiques d'un échantillon à examiner. La dénaturation d'un acide nucléique double brin peut être effectuée par les méthodes connues de dénaturation chimique, physique ou enzymatique, et en particulier par chauffage à une température appropriée, supérieure à 80 °C.

Pour mettre en oeuvre les techniques d'hybridation précitées, et en particulier les techniques " sandwich ", une sonde de l'invention, appelée sonde de capture, est immobilisée sur un support solide, et une autre sonde de l'invention, appelée sonde de détection, est marquée avec un agent.

Les exemples de support et d'agent marqueur sont tels que définis précédemment.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins un spirochète, dans un échantillon contenant ou susceptible
 5 de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, comprenant les étapes consistant à mettre en contact ledit échantillon avec au moins une sonde de genre de l'invention, puis à déterminer de façon connue en soi la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

10 Des exemples de détection de la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique comprennent les techniques décrites ci-dessus, à savoir les techniques "DOT-BLOT", "SOUTHERN-BLOT" et "sandwich".

Selon une mise en oeuvre particulière de ce procédé pour la détermination de la
 15 présence ou l'absence d'une espèce ou d'un groupe d'espèces de spirochète, on utilise d'une part une sonde de genre de l'invention et d'autre part une sonde d'espèce de l'invention, étant entendu que lesdites sondes de genre et d'espèce sont capables de s'hybrider avec des régions non chevauchantes d'un acide nucléique correspondant au gène *rpoB* des spirochètes.

20 De manière avantageuse, la sonde de genre est immobilisée sur un support solide, et la sonde d'espèce est marquée avec un agent marqueur.

La présente invention a aussi pour objet l'application du procédé de l'invention pour déterminer la présence d'une espèce de spirochète déterminée.

En effet, les résultats des recherches, mettant en évidence les alignements de
 25 séquences conservées chez les espèces de spirochètes, selon la méthode d'alignement CLUSTAL [Higgins D.G. & Sharp P.M. (1989) Gene 73:237-244], lesdites séquences ayant 1170 bases situées entre les positions 1730 et 2900 du gène *rpoB* en faisant référence à la numérotation du gène *rpoB* de *Escherichia coli* ATCC 25290, permettent de détecter la présence ou l'absence d'au moins une bactérie quelconque
 30 de l'ordre des spirochètes. L'utilisation de sondes contenant des zones mutées pour une espèce particulière (par rapport à l'espèce de référence, ici *E. coli*), rend possible

la détection directe d'une telle espèce. Dans les techniques d'hybridation sandwich, utilisant deux sondes en combinaison (sonde de capture et sonde de détection), on utilisera par exemple en combinaison une sonde spécifique de la famille des spirochètes et une sonde spécifique de l'espèce considérée. On peut aussi utiliser en
 5 combinaison deux sondes spécifiques de ladite espèce, lorsqu'elles existent, ces deux sondes étant complémentaires de régions non chevauchantes du gène *rpoB*.

Une autre application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques
 10 incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à 4, qui est utilisable dans la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase par un procédé connu en soi, notamment dans des méthodes d'amplification utilisant une telle synthèse en présence d'une polymérase (PCR, RT-PCR, etc.). En particulier, une amorce de l'invention peut être utilisée pour la transcription inverse spécifique d'une séquence
 15 d'ARN messenger d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces de spirochètes pour obtenir une séquence d'ADN complémentaire correspondante. Une telle transcription inverse peut constituer le premier stade de la technique RT-PCR, le stade suivant étant l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire obtenu. On peut également utiliser les amorces de l'invention pour l'amplification spécifique par
 20 réaction de polymérisation en chaîne de la séquence de l'ADN du gène *rpoB* d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces de spirochètes.

Selon un cas particulier, ladite amorce comprenant un oligonucléotide de l'invention comprend en outre la séquence sens ou anti-sens d'un promoteur reconnu par une ARN polymérase (promoteurs T7, T3, SP6 par exemple [Studier FW, BA
 25 Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189:113] : de telles amorces sont utilisables dans des procédés d'amplification d'acide nucléique faisant intervenir une étape de transcription, tels que, par exemple, les techniques NASBA ou 3SR [Van Gemen B. et al. Abstract MA 1091, 7th International Conference on AIDS (1991) Florence, Italy]

30 Un autre objet de l'invention est une amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence

d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID n°1 à SEQ ID N°4 qui est utilisable pour le séquençage total ou partiel du gène *rpoB* chez une quelconque des espèces de spirochètes. En particulier, l'amorce nucléotidique est utilisable pour le séquençage d'un acide nucléique amplifié.

5 En effet, les amorces oligonucléotidiques objets de l'invention permettent l'amplification puis le séquençage du gène *rpoB* chez tout spirochète, et l'identification de tout spirochète par analyse bio-informatique de cette séquence et la reconnaissance de nouvelles espèces de spirochètes inconnues. Le séquençage est l'obtention de la séquence totale ou partielle du gène *ropB* par un procédé connu en
10 soi, polymérisation absorbative utilisant des di-déoxynucléotides [Sanger F., Coulson A.R. (1975) J. Mol. Biol. 94:441] ou hybridations multiples utilisant les puces à ADN.

Enfin, un dernier objet de l'invention est une sonde de thérapie génique pour traiter les infections provoquées par au moins une espèce ou un groupe d'espèces de
15 spirochètes, ladite sonde comprenant un oligonucléotide tel que défini précédemment. Cette sonde de thérapie génique, capable de s'hybrider sur l'ARN messager et/ou sur l'ADN génomique desdites bactéries, peut bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription et/ou de réplication.

Le principe des méthodes de thérapie génique est connu et repose notamment
20 sur l'utilisation d'une sonde correspondant à un brin anti-sens : la formation d'un hybride entre la sonde et le brin sens est capable de perturber au moins l'une des étapes du décryptage de l'information génétique. Les sondes de thérapie génique sont donc utilisables comme médicaments antibactériens, permettant de lutter contre les infections causées par des spirochètes.

25 L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 et 2 sur lesquelles :

- la figure 1 est une photographie d'un gel d'électrophorèse mettant en évidence
30 la détection des spirochètes à partir d'une suspension mixte bactérienne en utilisant les sondes de l'invention ; et

- la figure 2 est une photographie d'un gel d'électrophorèse mettant en évidence l'amplification spécifique par PCR de fragments du gène *rpoB* des spirochètes en utilisant les amorces de l'invention.

Les souches de spirochètes utilisées dans les exemples ci-après, à savoir
 5 *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa*
serovar patoc (appelée ci-après *Leptospira biflexa*), *Leptospira interrogans serovar*
icterohaemorrhagiae (appelée ci-après *Leptospira icterohaemorrhagiae*) et
Leptospira interrogans serovar australis (appelée ci-après *Leptospira australis*), ont
 toutes été obtenues de la collection ATCC, à l'exception de *Borrelia recurrentis* qui
 10 est disponible auprès du Centre National de référence, Institut Pasteur Paris (France).
 Le numéro ATCC de *Borrelia burgdorferi* est 35210, celui de *Treponema Pallidum*
 27087, celui de *Leptospira biflexa* 23582, celui de *Leptospira icterohaemorrhagiae*
 43642 et celui de *Leptospira australis* 23605.

Les souches *Borrelia* et *Leptospira* ont été cultivées à 30°C sur les milieux
 15 BSKII et EMJH, respectivement [Barbour A.G. (1984) Yale J. Biol. Med. 57:521].
 Comme *T. pallidum* ne peut pas être cultivée *in vitro*, cette bactérie pathogène a été
 propagée par injections dans les testicules d'un lapin.

Les autres souches de bactéries utilisées, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*
aureus, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont été isolées
 20 cliniquement de patients hospitalisés à Marseille.

EXEMPLE 1 : Détection spécifique des spirochètes à l'aide des sondes de l'invention

Cette expérience a été réalisée avec les souches de spirochètes suivantes :
 25 *Borrelia burdorferi*, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira*.
Icterohaemorrhagiae, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis*, ainsi qu'avec
Staphylococcus aureus.

On a préparé une suspension bactérienne mixte en mélangeant un ADN de
 spirochète avec un extrait de *Staphylococcus aureus*.

30 On a réalisé une méthode PCR en utilisant la trousse QIAamp tissue kit
 (Qiagen) et la Taq Polymérase de Gibco (Gibco BRL, USA). Après une première

étape de dénaturation (94°C pendant 2 min), on a répété 35 fois un cycle de 3 étapes à 94°C pendant 30 s, 52°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On a terminé le programme PCR, on a purifié et séquencé les amplicons résultants comme indiqué précédemment.

- 5 Les résultats sont indiqués sur la figure 1, sur laquelle
la bande 1 correspond aux marqueurs de masse moléculaire (Boehringer),
la bande 2 correspond à *S. aureus* seul,
la bande 3 correspond à *B. burgdorferi* + *S. aureus*,
la bande 4 correspond à *B. recurrentis* + *S. aureus*,
10 la bande 5 correspond à *T. pallidum* + *S. aureus*,
la bande 6 correspond à *L. biflexa* + *S. aureus*,
la bande 7 correspond à *L. australis* + *S. aureus*,
la bande 8 correspond à *L. icterohaemorrhagiae* + *S. aureus*.

Les amorces utilisées étaient :

- 15 panneau A : les amorces d'ARNr 16S FD1 et RD3 [Weisburg et al. J. Bacteriol. (1991) 173:697-703]

panneau B : les amorces 1730D et 2900R de l'invention.

L'amorce 1730D a la séquence SEQ ID N°1 dans laquelle "n" est l'inosine et l'amorce 2900R a la séquence SEQ ID N°2 dans laquelle "n" est l'inosine.

- 20 Les résultats montrent que les amorces de l'invention n'ont pas été capables d'amplifier l'ADN de *S. aureus* seul, et donc de détecter *S. aureus*, mais ont été capables d'amplifier celui des spirochètes, et donc de le détecter, même en présence de *S. aureus* (panneau B), contrairement aux amorces 16S qui ont été capables d'amplifier l'ADN de *S. aureus* seul (panneau A).

25

EXEMPLE 2 : Amplification spécifique de fragments de gène *rpoB* à l'aide des amorces de l'invention

- Cette expérience a été réalisée avec les souches de spirochètes suivantes :
Borrelia burgdorferi, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira*
30 *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis*, ainsi qu'avec les

autres souches non spirochètes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La séquence du gène *rpoB* de *Treponema pallidum* utilisée est celle décrite par Weinstock et al. [(1998) The genome of *Treponema pallidum* : new light on the agent
5 of syphilis. *FEM Microbiol. Rev.* 22:323-332].

La séquence du gène *rpoB* de *Borrelia burgdorferi* utilisée est celle décrite par Alekshun et al. [(1997) Molecular cloning and characterization of *Borrelia burgdorferi* *rpoB*. *Gene* 186:227-235].

Les séquences d'ADN du gène *rpoB* de *Leptospira biflexa*, *Leptospira*
10 *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis* ont été obtenues par PCR de la façon suivante :

L'ADN génomique de *Leptospira biflexa* a été extrait en suivant les procédures standards au phénol/chloroforme [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY]. Dans cette première étape
15 d'expériences, on a réalisé les amplifications par PCR avec les amorces SEB1 (5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3') et SEB2 (5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3') (SEB pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Borrelia subtilis*) et la *Taq* ADN polymérase de Eurogentec (de la société Seraing, Belgique) en utilisant 5 µl d'ADN pour un volume final de 50 µl.
20 Après une première étape de dénaturation (95°C pendant 1,5 min), on a répété 35 fois un cycle à 3 étapes de 95°C pendant 20 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On a terminé le programme PCR par une seule étape d'extension de 3 min à 72°C (modèle de cycle thermique Peltier PTC 200, MJ Research, Watertown, MA, USA).

On a ensuite séparé les amplicons obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose
25 à 1% et on les a visualisés par coloration avec du bromure d'éthidium.

On a réalisé le séquençage du gène par purification des échantillons avec le kit de purification PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Allemagne) et on les a mis à réagir avec le tampon de réaction dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction buffer (kit de séquençage d'ADN, Perkin-Elmer). Enfin, on a effectué une
30 électrophorèse des produits réactionnels avec le séquenceur d'ADN automatique Applied Biosystems model ABI 310 (Perkin-Elmer).

La séquence de l'extrémité 5' du gène *rpoB* a été obtenue en utilisant la trousse Universal Genome Walker™ (Clontech, Palo Alto, CA, USA) de la façon suivante. Cinq regroupements de fragments d'ADN génomique appelés "banques" Genome Walker ont été construits en utilisant les enzymes de restriction *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*,
 5 *ScaI* et *StuI*. Ces banques ont été utilisées pour un séquençage en amont de l'ADN génomique en utilisant, d'une part, une amorce spécifique du gène dont la séquence correspond à la région aussi proche que possible de l'extrémité 5' connue du gène et, d'autre part, une amorce d'adaptation fournie dans la trousse.

On a purifié les fragments amplifiés et on a utilisé une source d'ADN pour une
 10 deuxième PCR emboîtée. On a ensuite traité les amplicons obtenus comme décrit précédemment pour le séquençage automatisé.

Le gène *rpoB* de *Leptospira biflexa* obtenu a la séquence SEQ ID N°5 et possède 3876 acides nucléiques. Le gène *rpoB* de *Leptospira icterohaemorrhagiae* obtenu a la séquence SEQ ID N°6 et possède 914 acides nucléiques. Le gène *rpoB* de
 15 *Leptospira australis* obtenu a la séquence SEQ ID N°7 et possède 949 acides nucléiques. Enfin, le gène *rpoB* de *Borrelia recurrentis* obtenu a la séquence SEQ ID N°8 et possède 800 acides nucléiques.

Les séquences d'ADN du gène *rpoB* de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa* sont décrites dans la
 20 littérature (Gen Bank).

Les fragments du gène *rpoB* à amplifier étaient constitués de 949 pb.

Les amplifications par PCR des fragments du gène *rpoB* ont été réalisées comme dans l'exemple 3, à ceci près qu'on a utilisé chaque espèce séparément.

Les résultats sont indiqués sur la figure 2, sur laquelle :

- 25 la bande 1 correspond aux marqueurs de masse moléculaire (Boehringer),
 la bande 2 correspond à *B. burgdorferi*,
 la bande 3 correspond à *B. recurrentis*,
 la bande 4 correspond à *T. pallidum*,
 la bande 5 correspond à *L. biflexa*,
 30 la bande 6 correspond à *L. australis*,
 la bande 7 correspond à *L. icterohaemorrhagiae*,

- la bande 8 correspond à *E. coli*,
la bande 9 correspond à *S. aureus*,
la bande 10 correspond à *Str. salivarius*,
la bande 11 correspond à *Ps. aeruginosa*,
5 la bande 12 correspond à un témoin négatif sans ADN.

Les amorces utilisées étaient :

panneau A : l'amorce 1730D et l'amorce 2900R de l'invention,
panneau B : l'amorce 1730D et l'amorce 3800R de l'invention et
panneau C : les amorces d'ARNr 16S RD1 et FD3.

- 10 L'amorce 3800R a la séquence SEQ ID N°4 dans laquelle "n" est l'inosine.

Les résultats montrent que les amorces de l'invention ont permis uniquement l'amplification des fragments de l'ADN des spirochètes (panneaux A et B), tandis que les amorces 16S ont tout amplifié (panneau C).

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> Raoult, Didier

<120> Oligonucléotides monocaténares, sondes, amorces
et procédé de détection des spirochètes

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°1

<400> 1

cttggnccng gnggactttc

20

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°2

<400> 2

agaaatnaan atngcatcct c

21

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°3

<400> 3

gggtgnattt tntcatcnac

20

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°4

<400> 4

gcttcnagng cccanac

17

<210> 5

<211> 3876

<212> ADN

<213> Leptospira biflexa

<400> 5

gctgatatta agaaaaaact ncgaaggtnt tgggnctcaa gtagaagttg ctgggtgccc 60
gggtaaatcgg ttgcccatt tttaaaccac gtcttcaaaa acttagaggc agggaggccg 120
taggcgtccc cacctctatt ttttcgttta tcataccatc tattattttg acgtctctag 180
ggagagtatt ccatgcatac ccgaatgcaa attagaaacc gggtaaaatt cggtaaaatt 240
accgacctca atttacttcc taatcttacc tacgtacaga aaaaatcctt tgattgggtc 300

ctccagtcgg	aagtgaaga	tcgacgaaa	cgtttgaacc	aaggggttga	agcgggtattc	360
cgcgaaatcat	tcccaatcga	atcaccaaac	aacgatatgg	tcatggaata	tggccattac	420
gttttgggag	agccgaaacg	cgatccccc	gagtgcaaag	acactgatcc	ttcttttgct	480
gttccactga	aagcagtcac	ccgtctcatc	atcaaagaca	ccggtgaaat	ccgcgaacaa	540
gtcgtctaca	tgggtgacct	tcctgtgatg	acagaccacg	gaactttcat	catcaatggg	600
gccgaaaggg	tagtggttaag	ccagttacac	cgatctcctg	gtattttctt	ttcgtatgac	660
caagtacgag	atacattttc	tgcccagagtg	attccttatc	gtggatcatg	gttagaattc	720
gagatggaca	acaaggggaat	cctcgttgcc	aaaatcgacc	gtaagaaaaa	attcccagcg	780
actctccttg	tgaagcccat	gggtatggga	acaaacgaag	aagtacttcg	ccttttctac	840
ggatctagca	aaatgaaaat	cgctgggtgcc	aatccaaaag	acctcaaacg	tctgattggc	900
cgccgaacca	ttgcggatat	tatcaatatg	gaaaccgggtg	aggtaatgct	cgatgctggg	960
tccaaaatta	acgaagacaa	tatctccatc	cttcgtgaaa	tgaaggtaaa	agaagtggat	1020
gtcatcgaaat	ttccaaaagg	aaaagacaat	ccagttctca	tcaattgcct	agaaaaagac	1080
ggagtgaacg	actacgagga	tgcagtgaag	aaatttcaca	cgatcatgcg	tccaggggaa	1140
ccttctacga	ttgaaaacgc	ggaagctgag	ttaaaacgcc	tctttttctc	tccaaaaacg	1200
tttgatttag	gaattgttgg	tcgttacaaa	atcaatagca	aattcgagtt	caacaatcca	1260
aaagaattct	caaaagcaga	tgatcgggtt	ctccgaaaac	aagacatcat	cgaaaccggt	1320
cgttaccttg	tgatgcttat	gtcagaagcg	gaaaattatt	acccagatga	cattgaccac	1380
ttaggaaaca	gaaggatccg	ttcgggtggg	gaactcatcg	ctaaccaatt	gaaacttggg	1440
ttttccagag	tggaacgagt	catcaaagaa	aggatgacag	tacaggagcc	ggaacaacaa	1500
actcctcagc	ttcttatctc	catcaaacca	atcacagcag	tgatcaatga	gttttttgga	1560
tcttcgcaac	tctctcagtt	tatggacca	accaatccct	tggcagaact	tacgcacaaa	1620
cgtaggttaa	acgctcttgg	gcctgggtga	ctttctcgtg	atagagcagg	ttttgaggtt	1680
cgtgacgttc	attattctca	ctacggctcg	atgtgcccca	ttgaaacacc	ggaagggtcca	1740
aacattgggtc	tcattctttc	catgtctagt	tttgcacgtg	tgaacgatta	tggattcatt	1800
gaaactccat	accgccttgt	aaagaatgga	aaagtccaaa	aacaagtgga	atacctcact	1860
gcggacaaaag	agaatatcca	ttatatggcg	cagtcaaat	cgactgtgga	tgagaaggga	1920
gaattcactt	ccaaactcat	ttccactcgt	catagagggg	atttcccttt	ccgtagccca	1980
gctgaaatcc	aatacatgga	tcttgctccc	ttgcaagtgg	tctcagtttc	cacagctctc	2040
attccgttct	tagaacatga	tgacgcgaac	cgtagccctca	tgggttccaa	catgcaacgc	2100
caagcgggtac	cactcttaac	agaagaggct	ccttttgtcg	gaactgggtat	ggaagctcgt	2160
gcggccttatg	acgcaggggt	ttgtatcggt	gcgaaaaaag	atgggtgtgg	ttccaaagtg	2220
gatgcaacag	gtgtttggat	caaagaagac	caatccaaaag	agattgtcca	ttaccactc	2280
attaaattca	aaaaaaccaa	ccaaggtact	tgttttaacc	aaaaaccaa	cgtatccatg	2340
ttacacacca	caactgggtg	caaggtaagt	aaggtttcga	aagaacgtgt	cgaagtgcga	2400
actcctaacy	gagaaaaaga	aactcatgaa	cttcttcttt	ctgatgaagt	tcagttccat	2460
gctgttgtca	aagaaggaca	agaggttaga	attggagctc	cagttgccgg	acaaatcatc	2520
aaaggggaaa	aatacgggtg	cttcgggtcag	atccttcaaa	aaggaaactgt	cctagccaac	2580
gggccatcca	ctgacgctgg	gtattttggca	cttggacgaa	atgttctcgt	tgcctttatg	2640
ccttgggaag	gatacaactt	tgaggatgcg	atttttaatt	ctgaacgaat	catcaaaagc	2700
gatgttttct	cttccatcca	cattgaagaa	ttcgaatatcc	aagctcggga	aacgaaactc	2760
ggacaagaac	aaatcactcg	tgacattcca	aacctttcgg	acaaagcggt	ccgtgatttg	2820
gatgagtcg	gtgtgatccg	tgtgggtgca	gaggtaaaac	ctggagacat	cctagttggg	2880
atggtgactc	caaaagggga	aacagacctc	acacctgaat	acaaactatt	acactccatt	2940
tttgagaga	aggcaaaaaga	agttagggat	tcctcactcc	gtatgccaaa	cgggtttcgaa	3000
ggaactgtca	tcgatatcaa	acgttatctc	cgtgaaacag	gcgatgaact	cgctgctggc	3060
gtggaagaaa	tggtaaaagt	ttacgtggct	cgcaaacgga	aactcctcgt	gggtgataag	3120
atggccggaa	gacacgggaa	caaaggggtc	gtagcacgtg	tgatggcaca	agaagatatg	3180
ccatacatgg	aagacggatc	tccagttgac	atcgtactca	accactcgg	tgttccttcg	3240
cgatgaacc	tcggtcagat	ccttgaaact	caacttggat	ttgctgcaaa	aaaactaggg	3300
atcaattttg	aaacccctgt	gtttgacgga	gcttccgaag	gtgatgtaaa	cgatttctgc	3360
aaaaaagcag	gattaccgga	aaacagcaaa	tttcagttat	atgatggaag	gactggtgaa	3420
aaattcatca	accaagtatt	ctgtggatac	atttacatgt	tgaaactggc	tcacttgggtg	3480
gatgacaaaa	ttcacgcaag	atccactgga	ccttactcac	tcgtaacaca	acaaccactg	3540
ggtggttaag	cgagttccgg	gggacaaagg	ttagggggaga	tggaagtttg	ggcactcgaa	3600
gcatacgggtg	cctcacacac	cttacaagaa	ttactgacca	tcaagtcaga	tgacatgctc	3660
ggacgtgcca	gaatttacga	agcaatttgt	aaagggatcc	actcgatcaa	accgggtatc	3720
cctgaatcct	tcaacgttct	tgtacaagaa	ctccgaggtc	tcgcacttga	tatcatcatc	3780
aaagactccg	aaggattgga	agtggatatc	tctgattacg	aagatgagtt	ctcgaaaaac	3840
aaaaagaaaa	ttaaattcga	gaccattgaa	aacggt			3876

<210> 6

<211> 914

<212> ADN

<213> *Leptospira icterohaemorrhagiae*

<400> 6

```

ttcactatctc tcaactacggt agaattgtgtc cgattgaaac tccggaaggt ccgaacatcg 60
gtctgattctt ttccatgtct tcttacgctc gtgtgaatga ctacggattc ttggaaactc 120
cttacagaac cgtgaagaac ggtaaagtta ccggtcagat cgagcacctt accgcagaca 180
aagaagaata tcattacatc gctcaagctt ccggcgtgat cgatgaaaaa ggcgagctca 240
aaaacaaatt gattttccacg cgtcacagag gggattttccc ttcccgtaac ccgagcgaga 300
ttcagtatat ggacttggck cctctacaag tcgtttcggt ttccacggcg ctgattccgt 360
tccttgaaca cgacgacgcg aaccgcgcct catgggttcc aacatgcaac gtcaggcggt 420
tcctcttctc cgtgaagaag ctcttttgtg ggaactggta tggaaaccag agccgcttac 480
gattccagaa tttgtatcgt aaacaaacac gacgggtgtcg taacttccgt cgatgcggaa 540
aacatcggtg tagaaagaaa gggcggaaaa gaatccgata cgtatcaact tacgaaattc 600
aaaaagacaa accaaggaac tgctttaatc agaagccgat tgtaggagtg gttcactccg 660
agatcaatgg aaaggtttcc -aagggttcca aagaaaaaat cgaagtcact ggtgaaaacg 720
gtgaactgaa agaatatgtt cttcaaatcg gaagcaaaaca atattctccg atcgtctctg 780
caggcgaaga agtaaaaaga ggatcgactc tcgcaggaca agttgttgta ggtgagaagt 840
tggatgagat gggaaatatc ctcgtaaaag gaaccgttct tgctgatggt cctgcggtcg 900
acaacggagt tctc

```

914

<210> 7

<211> 949

<212> ADN

<213> *Leptospira australis*

<400> 7

```

gtgacgttca ctattctcac tacggtagaa tgtgtccgat tgaaactccg gaaggtccga 60
acatcggtct gattctttcc atgtcttctt acgctcgtgt gaatgactac ggattcttgg 120
aaactcctta cagaaccgtg aagaacggta aagttaccgg tcagatcgag caccttaccg 180
cagacaaaga agaatatcat tacatcgctc aagcttccgg cgtgatcgat gaaaaaggcg 240
agctcaaaaa caaattgatt tccacgcgtc acagagggga ttcccttttc cgtaaccgca 300
gcgagattca gtatatggac ttggctctc tacaagtcgt ttccggtttcc acggcgctga 360
ttccggttct tgaacacgac gacgcgaacc gcgcctcat gggttccaac atgcaacgtc 420
aggcggttcc tcttcttcgt gaagaagctc cttttgtcgg aaccggtatg gaaaccagag 480
ccgcttacga ttccagaatt tgtatcgtaa acaaacacga cgggtgtcgt acttccgtcg 540
atgcggaaaa catcgttgta gaaagaaagg gcggaaaaga atccgatacg tatcaactta 600
cgaaattcaa aaagacaaac caaggaacct gctttaatca gaagccgatt gtaggagtgg 660
ttcactccga gattaacgga aagggttcca aggtctccaa agaaaaaatc gaagtcactg 720
gtgaaaacgg tgaactaaaa gaatatgttc ttcaaatcgg aagcaaaaca tattctccga 780
tcgtctccgc aggcgaagaa gtaaaacgag gatcgactct cgcaggacaa gttgtttag 840
gtgagaagtt ggatgagatg ggaaatatcc tcgtaaaagg aaccgttctt gctgatggtc 900
ctgcggtcga caacggagtt ctgcgtctgg gaagaaacgt tctcgcggc

```

949

<210> 8

<211> 800

<212> ADN

<213> *Borrelia recurrentis*

<400> 8

```

aagggatcga gcagctttga agtaagatat gtacattata cccattatgg taggatgtgt 60
cctattgaaa ctctgaagg cccaaatatt ggacttattg tttctttggc tacttattca 120
aaagttaatg attatggttt cttagaaact ccttatagga aggtgattga tggtaagggtg 180
accgatgata ttgaatatct gtctgctatt gatgaggaaa aaaaatgtat tgcgcaagca 240
aatgcttctg ttagtctcga tggtaattat actgatgatt tgggtgtctgt taggatttct 300
ggggattata ctacaatgat gcctaaaaat atcgattaca tggatgtttc gcctagacaa 360
ttaatatctg tctcttcggc gttaataact ttcttgaaca taatgatgca aatcgtgctc 420
ttatgggttc gaatatgcaa cgtcaggcag ttcttattat ttccacagcc acctattgtt 480
ggtacaggta tggagaggat agttgcaaaa gactctgggtg ttgttattaa agcaaaaaga 540
cctggtagag ttgtcttagc cacaacaaa aagatagtta ttaaacctga taatgcaact 600
tctgaacgag atttagatga atatgaactt tataaatatg agaggacaaa ccaggatact 660
tctttcaatc attcagtttt ggtgaagaat ggccaaattg ttaataagga tgagataata 720
gcagatggtc ctgctactag atatggagaa ttggcgcttg gtaataattt attagttgtt 780
ttattccgtg gaatggattt

```

800

REVENDECATIONS

1. Oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4 et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.

2. Sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries appartenant à l'ordre des *Spirochaetales* caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4 et leurs séquences complémentaires.

3. Sonde selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est immobilisée sur un support solide.

4. Sonde selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est marquée avec un agent traceur.

5. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins un spirochète dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, puis on détermine la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

6. Amorce nucléotidique utilisable pour la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon la revendication 1.

7. Amorce nucléotidique utilisable pour le séquençage total ou partiel du gène *rpoB* chez l'une quelconque des espèces de spirochètes, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide tel que défini à la revendication 1.

8. Amorce nucléotidique utilisable pour le séquençage d'un acide nucléique amplifié, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide tel que défini à la revendication 1.

9. Sonde de thérapie génique, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide tel que défini à la revendication 1.

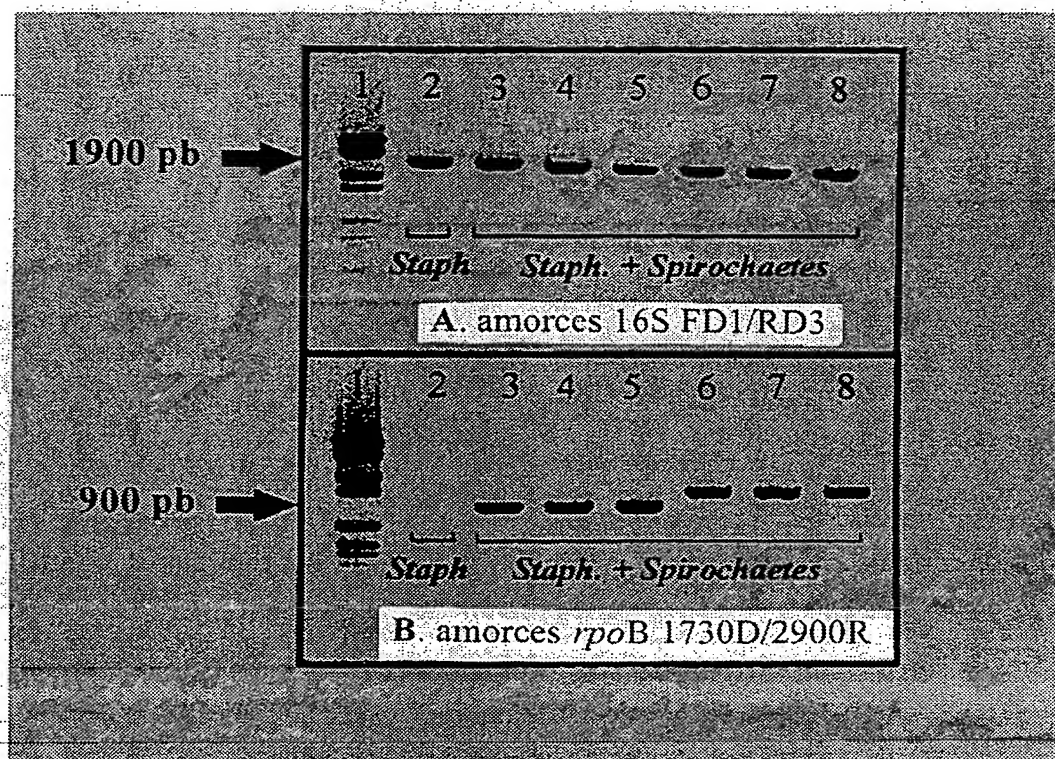


FIG.1

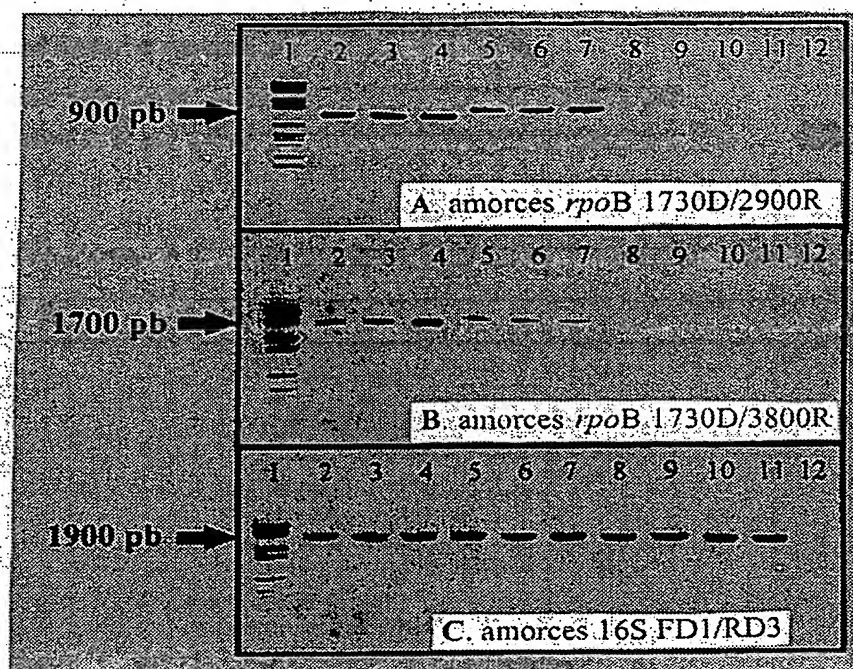


FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)